

Research Article

Vol. 17, No.4, 2026, p. 475-490



Effect of L-Serine Amino Acid and Choline Supplementation on Sperm Quality of Aged Broiler Breeder Roosters

Mahkam Alizadeh¹, Ali Aghaei^{1*}, Saleh Tabatabaei Vakili¹, Mahmoud Nazari¹

1- Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

*Corresponding Author's Email: aghaei@asnruk.ac.ir

How to cite this article:

Received: 15-07-2025

Revised: 26-09-2025

Accepted: 15-10-2025

Available Online: 03-02-2026

Alizadeh, M., Aghaei, A., Tabatabaei Vakili, S., & Nazari, M. (2026). Effect of L-serine amino acid and choline supplementation on sperm quality of aged broiler breeder roosters. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 17(4), 475-490. (in Persian with English abstract).

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.94457.1260>

Introduction: In recent years, the emphasis on improving growth traits and increasing body weight in broiler lines has led to a significant decline in reproductive performance in broiler breeder flocks (Blesbas et al., 2004). Reduced fertility has become a major challenge in broiler breeder management. Although roosters account for only 10% of the flock population, their role in fertility is estimated to be as high as 50% (Cerolini et al., 2006; Akhlaghi et al., 2014). Among the main factors contributing to declining fertility, age and nutrition are of particular importance. Fertility reduction is often attributed to obesity, lower semen quality, decreased libido, and reduced mating efficiency (Romero et al., 2008). Peak reproductive performance in male chickens and turkeys is observed between 30 and 40 weeks of age and gradually declines, nearly ceasing by 75 weeks (Noiraud & Brillard, 1999). Sperm count and fertilizing capacity increase from 24 weeks to a peak at 39 weeks, then decline by 72 weeks of age (Kelso et al., 1997). Enhancing the reproductive potential of aging broiler breeder males is therefore essential (Foad et al., 2020). Serine, a traditionally non-essential amino acid, plays critical roles in protein synthesis and cellular signaling (Metcalf et al., 2008; Hunter, 2012). Choline is an essential nutrient with key metabolic functions, including as a membrane phospholipid component, in hepatic lipid metabolism, and as a precursor of acetylcholine (Dudley, 1929). Choline is a methyl donor involved in methionine synthesis and indirectly functions in protein synthesis. In addition, it constitutes about 39% of the phospholipids in the plasma membrane and plays a role in cell maintenance and repair by synthesizing very low-density lipoproteins and providing phosphatidylcholine (Del Vesco et al., 2013). Despite numerous studies on the effects of unsaturated fatty acids, antioxidants, and some amino acids on sperm quality, no comprehensive study has been conducted on the interaction effects of the amino acid L-serine and choline supplementation in the nutrition of older broiler breeder roosters. This study investigated the effects of the amino acid serine and choline supplementation on sperm quality of older broiler roosters.

Materials and Methods: This experiment was conducted using 36 Ross 308 broiler breeder roosters at 45 weeks of age. Birds were randomly assigned to six groups of six individuals each and housed under controlled environmental conditions in a standard poultry house. The study was designed as a factorial arrangement in a completely randomized design with three levels of L-serine and two levels of choline. Birds were adapted to semen collection through abdominal massage for two weeks before the experiment. Semen volume was measured using a graduated collection tube (Zamiri et al., 2010). Sperm concentration was determined using modified Blaise-Tweel



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)

 <https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.94457.1260>

extender with a pH of 7.4 and osmolality of 310 mOsm/kg (Amini et al., 2015). Forward progressive motility was assessed by diluting semen samples in NaCl (1:20), placing a drop on a slide, covering it with a coverslip, and examining under a light microscope at 400× magnification (Akhlaghi et al., 2014). Plasma membrane functionality and integrity were assessed using the hypo-osmotic swelling test, while sperm viability and morphological abnormalities were determined by eosin-nigrosine staining (Tapeh et al., 2017).

Results and Discussion: Results showed that sperm concentration was significantly affected by different levels of serine and choline ($P \leq 0.05$). In the interaction of experimental groups, the highest sperm concentration was observed in the group receiving 0.3% serine and 470 mg choline, indicating a positive effect of these compounds on spermatogenesis and increased sperm production. The highest sperm concentration (4.08) occurred in the group containing 0.3% serine, while the control group had the lowest concentration (3.46). Consistent with this finding, Ansari et al. (2016) reported that oral supplementation of the non-essential amino acid aspartate in the diets of aging broiler breeder roosters significantly increased sperm concentration with rising intake levels. The combined effect of L-serine and choline supplementation also increased the percentage of progressive sperm motility during the trial weeks; this synergistic effect was significant in weeks 4, 5, 8, and 9 ($P \leq 0.05$). The highest progressive motility (50.75%) was recorded in week 8, whereas the lowest value (35.00%) was observed in the control group. In agreement with these results, adding serine to rooster semen as a diluent has been shown to improve sperm quality and fertility (Chankitisakul et al., 2022). The interaction of serine and choline significantly enhanced total sperm motility from week 5 to week 9. The highest total motility (88.75%) was obtained in the group with 0.15% serine and 470 mg kg⁻¹ choline in weeks 8 and 9, whereas the control diet yielded the lowest motility (70.00%), showing a significant difference from the combined group ($P \leq 0.05$). Analysis of sperm viability indicated that diets containing L-serine and choline had a significant effect on this trait ($P \leq 0.05$). The best viability was observed in the group receiving 0.3% serine with 470 mg kg⁻¹ choline, reaching 88.75% in weeks 8 and 9, which was significantly higher than the group lacking serine and choline ($P \leq 0.05$). The lowest sperm viability (68.25%) occurred in the control group. L-serine, through its antioxidant properties and the regulation of genes involved in glutathione synthesis, increases glutathione concentration and reduces oxidative reactions (Zhou et al., 2018; Sim et al., 2015). The combined use of serine and choline significantly improved sperm membrane integrity and health compared with the control, with this increase becoming significant from week 6 to week 9 ($P \leq 0.05$). The highest membrane integrity (88.00%) was observed in week 9 with 0.3% serine, while the lowest value (68.75%) belonged to the group without serine and choline. Evaluation of sperm abnormalities revealed that dietary supplementation with serine significantly affected this parameter ($P \leq 0.05$). Supplementation with L-serine at 0.15% and 0.3% reduced abnormal sperm percentages, with significant decreases observed in weeks 5 and 7. The lowest percentage of abnormal sperm (13.62%) occurred in the 0.3% serine group, which differed significantly from the diet lacking serine ($P \leq 0.05$). The effect of choline supplementation and the combined effect of serine and choline on abnormal sperm percentage were not significant ($P > 0.05$). These results agree with the findings of Long and Conn (2012), who reported that adding choline phosphate to duck semen extenders reduced acrosome head abnormalities.

Conclusion: The results of this study demonstrated that dietary supplementation with L-serine and choline significantly increased sperm concentration, sperm membrane integrity, total sperm motility, sperm viability, and progressive sperm motility, while reducing the percentage of sperm abnormalities during most weeks of the experimental period, indicating a synergistic effect of these two compounds on sperm quality in older broiler breeder roosters. Consequently, the combined supplementation of L-serine and choline may contribute to improved fertility potential and reproductive efficiency of older broiler breeder roosters under commercial poultry production conditions.

Keywords: Broiler breeder roosters, Choline, Fertility, L-serine, Membrane integrity, Sperm quality

اثرات اسیدآمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر کیفیت اسپرم خروس‌های مسن مادرگوشتی

مه‌کام علیزاده^۱، علی آقائی^{۱*}، صالح طباطبائی وکیلی^۱، محمود نظری^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۳

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر تغذیه‌ای اسیدآمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر کیفیت اسپرم در خروس‌های گله مادرگوشتی سویه راس ۳۰۸ بود. برای این منظور، ۳۶ قطعه خروس گله مادرگوشتی در سن ۴۵ هفتگی در قالب یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳ (سه سطح ال-سیرین و دو سطح کولین) به صورت طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و شش تکرار استفاده شد. پس از دو هفته دوره عادت‌دهی، آزمایش به مدت هفت هفته ادامه یافت. تیمارهای آزمایشی شامل جیره‌هایی با سطوح صفر، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد ال-سیرین و دو سطح افزودن کولین (صفر و ۴۷۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره) بودند. نمونه‌گیری اسپرم و بررسی کیفیت و کمیت آن‌ها به صورت هفتگی از تمامی خروس‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت اسپرم، جنبش پیش‌رونده، تحرک کل، سلامت غشاء اسپرم و زنده‌مانی اسپرم به طور معنی‌داری در تیمارهای حاوی سیرین و کولین نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. غلظت اسپرم، جنبش پیش‌رونده و سلامت غشاء اسپرم با تیمارهای حاوی ۰/۳ درصد مکمل سیرین به طور معنی‌داری دارای بالاتر از شاهد بود. درصد تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم با تیمارهای حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سیرین و ۴۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم مکمل کولین به طور معنی‌داری نسبت به گروه فاقد سیرین و کولین افزایش پیدا کرد. درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی ناهنجار در تیمارهای حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سیرین به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. مکمل کولین و اثر متقابل سیرین و کولین تأثیری بر ریخت‌شناسی ناهنجار نداشتند. افزودن سیرین و مکمل کولین به جیره سبب افزایش حدود ۱۵ درصدی جنبش اسپرم، افزایش حدود ۱۹ درصد تحرک کل، افزایش تقریبی ۲۱ درصدی زنده‌مانی و افزایش ۱۲ درصدی سلامت غشاء اسپرم شد. براساس نتایج به دست آمده، استفاده از سطوح مورد مطالعه اسیدآمینه ال-سیرین و مکمل کولین در جیره غذایی موجب بهبود کیفیت اسپرم و احتمال افزایش باروری در خروس‌های مسن گله‌های مادرگوشتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تحرک اسپرم، زنده مانای اسپرم، سلامت غشاء اسپرم، غلظت اسپرم

مقدمه

کاهش کیفیت منی، افت میل جنسی و کاهش کارایی جفت‌گیری نسبت داده شود (Romero et al., 2008). حداکثر بازده تولیدمثلی در خروس‌ها و بوقلمون‌های نر بین ۳۰ تا ۴۰ هفتگی مشاهده می‌شود، اما پس از آن کاهش می‌یابد و در حدود ۷۵ هفتگی تقریباً متوقف می‌شود (Noiraud & Brillard, 1999). طی این دوره، شمار اسپرم و قابلیت بارورسازی آن از ۲۴ هفتگی تا اوج باروری در ۳۹ هفتگی افزایش یافته و سپس تا ۷۲ هفتگی کاهش می‌یابد (Kelso et al., 1997). نشان داده شد که تغییرات گسترده‌ای در ترکیب لیپید اسپرم پرندگان با مسن‌تر شدن پرنده اتفاق می‌افتد. در اسپرم خروس نسبت های کل فسفولیپید، فسفاتیدیل سیرین و فسفاتیدیل کولین تغییرات برجسته‌ای را در دوره تولید مثلی نشان می‌دهد که با باروری مرتبط است (Cerolini et al., 2003). فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین عموماً مهم‌ترین گروه فسفولیپیدها در اسپرم خروس محسوب می‌شوند، آن‌ها به طور معمول با یک دامنه گسترده‌ای از اجزاء دیگر مثل فسفاتیدیل سیرین و اسفنگو میلین همراه می‌باشند

در سال‌های اخیر، تمرکز بر بهبود صفات رشد و افزایش وزن در لاین‌های گوشتی موجب کاهش قابل توجهی در عملکرد تولیدمثلی سویه‌های مولد شده است (Blesbois et al., 2004). امروزه کاهش باروری یکی از چالش‌های مهم در پرورش گله‌های مادرگوشتی محسوب می‌شود. با وجود اینکه خروس‌ها تنها ۱۰ درصد از جمعیت گله‌های مادر را تشکیل می‌دهند، اما نقش آن‌ها در باروری تا ۵۰ درصد اهمیت دارد (Cerolini et al., 2006; Akhlaghi et al., 2014). از میان عوامل مؤثر در کاهش باروری، سن و تغذیه اهمیت بیشتری دارند. کاهش باروری می‌تواند به عواملی مانند اضافه وزن،

۱- گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
(*) نویسنده مسئول: (Email: aghaei@asnrukh.ac.ir)

فسفولیپیدی را تشکیل می‌دهد (Surai et al., 1998). با وجود بررسی‌های متعدد در زمینه اثر اسیدهای چرب غیراشباع و آنتی‌اکسیدان‌ها و برخی از اسیدهای آمینه بر کیفیت اسپرم، تاکنون تحقیق جامعی در مورد اثرات متقابل اسیدآمینه‌ال‌سیرین و مکمل کولین در تغذیه خروس‌های مسن گله‌های مادرگوشتی صورت نگرفته است. این پژوهش به بررسی اثرات اسیدآمینه‌سیرین و مکمل کولین بر کیفیت اسپرم خروس‌های مسن گوشتی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ابتدا اسیدآمینه‌ال‌سیرین و مکمل کولین از شرکت اکسیر تأمین تجارت ماندگار (ایکس شیمی)، تهران، ایران خریداری شد.

پرندهگان، جایگاه و شرایط پرورش

این پژوهش، جهت انجام بخش مزرعه‌ای از ۳۶ قطعه خروس مسن مادرگوشتی راس ۳۰۸ تهیه‌شده از یک مزرعه تجاری با شرایط ظاهری سالم و تقریباً یکنواخت با سن ۴۵ هفته و میانگین وزن اولیه (200 ± 45 گرم) انجام شد. خروس‌ها در یک سالن پرورش استاندارد تحت شرایط محیطی کنترل‌شده، به شش گروه شش‌تایی دسته‌بندی و به‌طور کاملاً تصادفی در آشیانه‌ها نگهداری گردید. هر آشیانه حاوی یک آب‌خوری معلق و یک دان‌خوری بود. آب به‌صورت آزاد در طول آزمایش ارائه شد. خروس‌ها در طول دوره آزمایش از جیره‌های غذایی تنظیم‌شده و به‌مقدار معین به‌صورت یک بار در روز تغذیه شدند. روشنایی به‌صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. دمای سالن در محدوده ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد در طول دوره آزمایش حفظ شد.

تیمارهای آزمایشی

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل با سه سطح اسیدآمینه‌سیرین و دو سطح کولین انجام شد. تیمارها شامل ۱- جیره حاوی صفر درصد اسیدآمینه‌سیرین + صفر درصد کولین، ۲- صفر درصد سیرین + ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین، ۳- ۰/۱۵ درصد اسیدآمینه‌سیرین + صفر درصد مکمل کولین، ۴- ۰/۱۵ درصد اسیدآمینه‌سیرین + ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین، ۵- ۰/۳ درصد اسیدآمینه‌سیرین + جیره حاوی صفر درصد مکمل کولین و ۶- ۰/۳ درصد اسیدآمینه‌سیرین + ۴۷۰ میلی‌گرم کولین بودند. جیره پایه، براساس تأمین مواد مغذی توصیه‌شده در راهنمای پرورش خروس راس سویه ۳۰۸، (۲۰۱۹) تنظیم شد. اجزاء تشکیل‌دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره مورد استفاده در تغذیه خروس‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

(Darin-Bennett et al., 1974). کاهش اسپرم‌سازی و کیفیت اسپرم خروس همراه با کاهش در هر دو اسید چرب ۶-۴n:۴n و ۲۲-۶-۴n:۴n موجود در فسفولیپیدهای اسپرم است. قابل توجه است که نسبت بالای اسیدهای چرب ۶-۴n:۴n در کل فسفولیپیدهای اسپرم همبستگی منفی بالایی با افزایش سن خروس و همبستگی مثبت با جنایی و توان باروری دارد. یافته‌ها نشان می‌دهد که بین کاهش توان سلول‌های بیضه در سنتز و ساخت اسیدهای چرب ۶-۴n:۴n از ۲۲-۶-۴n:۴n و کاهش شمار و کیفیت اسپرم با افزایش سن همبستگی وجود دارد (Etches, 1996). در خروس‌های مسن مادرگوشتی بهبود پتانسیل تولیدمثلی بسیار مهم است (Fouad et al., 2020). سیرین یک اسیدآمینه‌ای است که به‌طور سنتی به‌عنوان یک ترکیب غیرضروری در نظر گرفته می‌شود، اما در سنتز پروتئین و سیگنال‌دهی سلولی نقش حیاتی دارد (Metcalfe et al., 2008; Hunter, 2012). افزودن سیرین به جیره غذایی می‌تواند تنش اکسیداتیو را کاهش داده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد (Zhou et al., 2018). از سوی دیگر، افزایش تنش اکسیداتیو می‌تواند منجر به تحلیل سلول‌های بیضه شده و در نهایت کاهش وزن بیضه و تولید اسپرم را به دنبال داشته باشد (Sarabia et al., 2013). فسفاتیدیل سیرین که به‌عنوان یکی از اجزاء کلیدی فسفولیپیدهای غشایی شناخته می‌شود، تأثیر مستقیمی بر باروری دارد. طبق مطالعات، میزان اسید چرب ۶-۴n:۴n:۲۲ (اسیددکوزاترا انوئیک) در فسفاتیدیل سیرین اسپرم بیش از ۳۳ درصد وزن تام اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهد که نشان‌دهنده نقش حیاتی این مولکول در تنظیم عملکردهای غشایی اسپرم پرندهگان است (Salem et al., 1986; Surai et al., 1998). کولین یک ماده مغذی ضروری با سه عملکرد متابولیک حیاتی است. این ماده عنوان یک جزء از فسفولیپیدهای غشایی، تنظیم متابولیسم لیپیدهای کبدی و جلوگیری از تجمع چربی در کبد و همچنین به‌عنوان پیش‌ساز استیل کولین در سیستم عصبی است، این مولکول همچنین با سنتز لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم و تأمین فسفاتیدیل کولین به‌طور غیرمستقیم در متابولیسم لیپیدی شرکت می‌کند (Do Nascimento et al., 2022). کولین به‌عنوان دهنده گروه‌های متیل در سنتز متیونین و به‌طور غیرمستقیم در سنتز پروتئین عمل می‌کند. علاوه بر این، حدود ۳۹ درصد از فسفولیپیدها موجود در غشاء پلاسما را تشکیل می‌دهد و با سنتز لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم و تأمین فسفاتیدیل کولین در نگهداری و ساخت سلول نقش دارد (Del Vesco et al., 2013). اهمیت کولین و مشتقات آن نظیر فسفاتیدیل کولین، در بهبود کیفیت اسپرم و باروری بوقلمون مورد توجه بسیاری از مطالعات قرار گرفته است (Long & Conn, 2012). فسفولیپیدها نوع اصلی لیپید موجود در غشاء اسپرم پرندهگان را تشکیل می‌دهند که فسفاتیدیل کولین ۳۹ درصد از کل محتوای

جدول ۱- اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره پایه (درصد)

Table 1- The ingredient and nutrient composition of base diets (%)

اجزای جیره	درصد	ترکیب شیمیایی	درصد
Ingredients (g)	%	Chemical composition	%
ذرت	56.00	انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری/کیلوگرم)	2800
Corn		Metabolizable energy (kcal/kg)	
کنجاله سویا	9.00	پروتئین خام	12.62
Soybean meal		Crude protein	
سیوس گندم	19.25	کلسیم	0.75
Wheat bran		Calcium	
جو	10.00	فسفر قابل دسترس	0.37
Barley		Available phosphorus	
روغن	2.25	لیزین	0.55
Fat		Lysine	
جوش شیرین	0.20	متیونین	0.39
Sodium bicarbonate		Methionine	
دی کلسیم فسفات	1.30	متیونین + سیستئین	0.64
Dicalcium phosphate		Cysteine + methionine	
پودر صدف	1.05	والین	0.55
Oyster shell		Valine	
نمک	0.27	ترئونین	0.45
Salt		Threonine	
دی ال - متیونین	0.18	سدیم	0.19
DL-methionine		Sodium	
مکمل ویتامین	0.25	کلر	0.19
Vitamin premix*		Chlorine	
مکمل معدنی	0.25		
Mineral premix**			

* هر کیلوگرم جیره حاوی: ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D₃، ۱۸ واحد بین المللی ویتامین E، دو میلی گرم ویتامین K₃، ۱/۸ میلی گرم ویتامین B₁، ۵/۵ میلی گرم ویتامین B₂، ۱۰ میلی گرم ویتامین B₃، ۳۰ میلی گرم B₅، سه میلی گرم ویتامین B₆، یک میلی گرم ویتامین B₉، ۰/۱۵ میلی گرم ویتامین B₁₂، ۰/۲ میلی گرم ویتامین H₂ بود.

** هر کیلوگرم جیره حاوی ۱۲۰ میلی گرم منگنز، ۴۰ میلی گرم آهن، ۱۲۰ میلی گرم روی، ۱۶ میلی گرم مس، دو میلی گرم ید و ۰/۳ میلی گرم سلنیوم بود.

* Supplied per kg diet: vitamin A, 9000 IU; vitamin D₃, 2000 IU; vitamin E, 18 IU; vitamin K₃, 2 mg; vitamin B₁, 1.8 mg; riboflavin, 1.1mg; vitamin B₁₂, 0.015 mg; vitamin H₂, 0.2 mg 55 mg; niacin, 10 mg; pantothenic acid, 30 mg; pyridoxine, 3 mg; vitamin B₉

** Supplied per kg diet: 120 mg manganese, 40 mg iron, 120 mg zinc, 16 mg copper, 2 mg iodine, 0.3 mg selenium.

ارزیابی حجم و غلظت منی

برای اندازه گیری حجم منی از لوله جمع آوری مدرج استفاده شد (Zamiriet al., 2010) برای تعیین غلظت اسپرم، به منظور رقیق سازی اسپرم از بلستویل تعدیل یافته با اسیدیت ۷/۴ و اسمولاریته ۳۱۰ میلی مول بر کیلوگرم (Amini et al., 2015) استفاده گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه برداشته شد و با دقت و به آرامی به فضای بین لام نئوبار و لامل تزریق شد، سپس لام نئوبار، شامل چهارخانه در گوشه و یک خانه در مرکز، شمارش و با استفاده از معادله ۱ غلظت هر میلی لیتر منی محاسبه شد (Akhlaghi et al., 2014).

$$C = N \times 5 \times 200 \times 10^4 \quad (1) \text{ معادله}$$

که در آن، C: غلظت اسپرم در هر میلی لیتر و N: مجموع تعداد اسپرم شمارش شده در پنج خانه است.

ارزیابی فراسنجه های کیفی اسپرم

تمامی خروس ها به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش به منظور کاهش تنش و عادت دهی با محیط به روش ماساژ شکمی برای اسپرم گیری عادت دهی شدند. در گرفتن نمونه منی، دقت لازم بر جلوگیری از آلوده نشدن منی با مدفوع و ادرار به عمل آمد. نمونه های اسپرم تمامی خروس ها بلافاصله بعد از جمع آوری در داخل یونولیت حاوی آب ۳۷ درجه سانتی گراد برای جلوگیری از شوک دمایی و نور خورشید، به آزمایشگاه منتقل شدند. فراسنجه های مورد بررسی که شامل غلظت منی، تحرک کل، جنبایی پیش رونده، یکپارچگی عملکرد و سلامت غشاء اسپرم، درصد اسپرم های نابهنجار، زنده ماندنی اسپرم بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی تحرک و جنبایی پیش‌رونده اسپرم

برای تعیین تحرک اسپرم به سمت جلو، نمونه‌های تازه مایع منی در محلول سدیم کلرید با نسبت ۲۰:۱ رقیق شدند، یک قطره از نمونه مایع منی رقیق شده روی یک لام قرار داده و با یک لامل پوشانده شد. در نهایت، بررسی میکروسکوپی تحرک اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $40\times$ مشاهده شد (Akhlaghi et al., 2014).

ارزیابی سلامت و یکپارچگی غشاء پلاسمایی

برای ارزیابی فعالیت غشاء پلاسمایی و یکپارچگی عملکردی غشاء اسپرم، از آزمون تورم هایپواسموتیک استفاده شد. در این آزمایش، بخشی از مایع منی (۱۰ میکرولیتر) با محلول هایپواسموتیک (۱۰۰ میکرولیتر) حاوی $57/6$ میلی‌مولار فروکتوز و $19/2$ میلی‌مولار سدیم سیترات انکوبه گردید. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. پس از آن، ۲۰۰ سلول در هر اسلاید با استفاده از میکروسکوپ کنتراست فاز مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم با دم متورم و پیچ‌خورده نشان‌دهنده سالم بودن غشاء اسپرم است.

ارزیابی زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرم

بررسی زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی اتوژین-نیگروزین تعیین شد. برای این ارزیابی، ۱۰ میکرولیتر مایع منی و ۱۰ میکرولیتر رنگ‌آئوژین-نیگروزین به‌طور کامل مخلوط شده، گسترش تهیه گردید و اجازه داده شد تا لام در هوا خشک گردد. سپس لام زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌های با رنگ صورتی و قرمز مرده و اسپرم‌هایی که بی‌رنگ بودند به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند. اسپرم با سرهای جداشده، سرهای انحرافی، سر بدشکل، دم خمیده، دم پیچ‌خورده، دم دوتایی و قطرات پروتوپلاسمی، غیرطبیعی در نظر گرفته شد (Tapeh et al., 2017). در این رنگ‌آمیزی، سر اسپرم‌های مرده به‌دلیل نقص در غشاء، رنگ را جذب کرده و قرمز می‌شوند، درحالی‌که اسپرم‌های زنده، رنگ را به خود نمی‌گیرند (Andraszek et al., 2018).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل برای بررسی تأثیر سطوح جیره‌ای اسیدآمینو سرین و مکمل کولین در جیره خروس‌های مسن مادرگوشتی و اثرات متقابل بین دو فاکتور جیره‌ای به‌روش GLM در نرم‌افزار آماری SAS (مدل ۹/۱) آنالیز شدند. پیش از انجام آنالیز، نرمال بودن توزیع داده

های آزمایشی با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و رویه UNIVARIATE مورد آزمون قرار گرفت. مدل آماری به‌کاررفته به‌صورت معادله ۲ است.

$$y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + e_{ijk} \quad (2) \text{ معادله}$$

که در آن، y_{ijk} : مقدار هر مشاهده، μ : میانگین کل، C_i : اثر سطوح کولین، T_j : اثر سطوح سرین، $(CT)_{ij}$: اثر متقابل سرین و کولین و e_{ijk} : اثر خطای آزمایش است. نتایج در سطح احتمال پنج درصد بررسی گردید و میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

اثر سطوح مختلف اسیدآمینو ال سرین و مکمل کولین بر غلظت اسپرم خروس‌های مسن مادرگوشتی در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش نشان داد که غلظت اسپرم در تیمارهای مختلف به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف سرین و کولین قرار گرفت ($P \leq 0.05$)، به‌طوری‌که غلظت اسپرم تیمارهای دریافت‌کننده مکمل ال-سرین و کولین در بالاترین سطوح استفاده باعث افزایش معنی‌دار غلظت اسپرم از هفته چهارم تا هفته نهم نسبت به گروه شاهد شد ($P \leq 0.05$). در اثر متقابل تیمارهای آزمایشی، بیشترین مقدار غلظت اسپرم در تیمار حاوی ۰/۳ درصد سرین و ۴۷۰ میلی‌گرم کولین مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت این ترکیبات بر اسپرماتوژنز و افزایش تولید اسپرم است. بالاترین مقدار غلظت اسپرم ($4/08$ میلیارد در میلی‌لیتر) در تیمار حاوی ۰/۳ درصد سرین بود. از سوی دیگر، تیمار شاهد کمترین میزان غلظت اسپرم ($3/46$ میلیارد در میلی‌لیتر) را در بین تمامی تیمارها داشت که نشان می‌دهد، فقدان این مکمل‌ها می‌تواند تولید و کیفیت اسپرم را محدود کند. هم‌سو با این گزارش، در مطالعه‌ای استفاده از سطوح مختلف اسیدآمینو غیرضروری آسپاراتات به‌صورت کپسول خوراکی در جیره خروس‌های مسن مادرگوشتی با افزایش سطوح مصرف، افزایش معنی‌داری را در غلظت اسپرم نشان داد (Ansari et al., 2016). گزارش شده است که استفاده از مکمل ال آرژنین یا افزودنی‌های مشتق‌شده از اسیدآمینو ال آرژنین در جیره غذایی خروس‌های مسن باعث افزایش غلظت اسپرم، بهبود جنبایی پیش‌رونده اسپرم، نفوذ اسپرم، افزایش زنده‌مانی، افزایش سطح تستوسترون در گردش خون و افزایش باروری و توانایی تولیدمثلی در خروس‌های مولد مسن می‌شود (Abbaspour et al., 2019) که با یافته‌های حاصل از این تحقیق هم‌خوانی دارد.

جدول ۲- اثر اسید آمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر غلظت اسپرم (میلیارد در میلی لیتر) خروس‌های مسن مادرگوشتی

Table 2- The effect of L-serine amino acid and choline supplementation on sperm concentration (billion per milliliter) of aged broiler roosters

تیمارها Treatments	هفته week						
	سوم Third	چهارم Fourth	پنجم Five	ششم Six	هفتم Seventh	هشتم Eight	نهم Nine
*S							
0	3.59 ^b	3.67 ^b	3.65 ^b	3.69 ^b	3.66 ^b	3.64 ^c	3.62 ^b
0.15	3.69 ^a	3.78 ^a	3.78 ^a	3.79 ^a	3.78 ^a	3.90 ^b	3.97 ^a
0.3	3.64 ^{ab}	3.77 ^a	3.82 ^a	3.81 ^a	3.82 ^a	4.01 ^a	4.04 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.022	0.019	0.017	0.022	0.012	0.026	0.045
**C							
0	3.61 ^b	3.74	3.71 ^b	3.75	3.72 ^b	3.79 ^b	3.82 ^b
470	3.67 ^a	3.74	3.80 ^a	3.78	3.80 ^a	3.91 ^a	3.94 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.018	0.015	0.014	0.018	0.015	0.022	0.037
C × S							
0 × 0	3.55	3.62 ^b	3.56 ^c	3.61 ^b	3.59	3.47 ^c	3.46 ^c
470 × 0	3.62	3.72 ^a	3.75 ^b	3.76 ^a	3.74	3.80 ^b	3.78 ^b
0 × 0.15	3.67	3.80 ^a	3.76 ^b	3.81 ^a	3.76	3.89 ^b	3.92 ^{ab}
470 × 0.15	3.70	3.75 ^a	3.79 ^{ab}	3.77 ^a	3.80	3.91 ^{ab}	4.03 ^a
0 × 0.3	3.60	3.79 ^a	3.79 ^{ab}	3.84 ^a	3.80	4.01 ^a	4.08 ^a
470 × 0.3	3.68	3.75 ^a	3.85 ^a	3.82 ^a	3.85	4.02 ^a	4.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.032	0.026	0.025	0.031	0.026	0.037	0.064
سطح احتمال معنی داری P-value							
S	0.0192	0.0019	<0.0001	0.0006	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C	0.0371	0.8791	0.0002	0.2289	0.0016	0.0011	0.0345
S×C	0.6673	0.0185	0.0111	0.0134	0.1062	0.0005	0.0206

*S: درصد سیرین افزوده شده به جیره، **C: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری باشند ($P \leq 0.05$).

mg in kg of choline added to the diet. Percentage of serine added to the diet C**
In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$)

نتایج ارائه شده در جدول ۳ گواه این مطلب است که جیره‌های حاوی سیرین و کولین تفاوت معنی داری را به لحاظ درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم نسبت به گروه فاقد این مکمل‌ها نشان دادند ($P \leq 0.05$). اثرات متقابل دو ماده آزمایشی ال-سیرین و مکمل کولین، افزایش درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم را در هفته‌های آزمایش نشان داد که این هم‌افزایی دو تیمار در هفته‌های چهارم و پنجم و هشتم و نهم معنی دار بود ($P \leq 0.05$). بالاترین درصد جنبایی (۵۰/۷۵) در هفته هشتم به دست آمد. کمترین درصد جنبایی پیش‌رونده مربوط به شاهد (۳۵/۰۰) بود. افزودن سیرین و مکمل کولین به جیره سبب افزایش حدود ۱۵ درصدی جنبایی اسپرم پرندگان مسن شد. موافق با این نتایج، افزودن اسید آمینه سیرین به منی خروس به عنوان نگهدارنده و رقیق‌کننده منی باعث افزایش کیفیت اسپرم و باروری شد

حرکت اسپرم نسبتاً شدید و تند است و برای حفظ تحرک نیاز به تولید آدنوزین تری فسفات زیادی دارد، تعداد زیاد میتوکندری موجود در قطعه میانی اسپرم، این میزان انرژی را فراهم می‌آورد (Guthrie et al., 2008). بنابراین با افزایش تعداد میتوکندری، انرژی لازم جهت حرکت اسپرم فراهم می‌گردد و با توجه به وجود سیرین و کولین در ساختار غشاء سلول و میتوکندری، بالارفتن جنبایی پیش‌رونده و تحرک اسپرم در نتیجه افزودن سیرین و کولین به جیره در مطالعه حال حاضر منطقی به نظر می‌رسد.

جدول ۳- اثر اسیدآمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر جنبایی پیش‌رونده اسپرم (درصد) خروس‌های مسن مادرگوشتی

Table 3- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on forward motility sperm (percentage) of old broiler roosters

تیمارها Treatments	هفته Week						
	سوم Third	چهارم Fourth	پنجم Five	ششم Six	هفتم Seventh	هشتم Eight	نهم Nine
S*							
0	42.87	39.50	40.25 ^b	40.87 ^b	39.62 ^b	38.75 ^b	39.37 ^b
0.15	41.12	40.25	42.12 ^{ab}	42.12 ^b	45.50 ^a	48.25 ^a	48.75 ^a
0.3	41.25	41.75	44.50 ^a	45.62 ^a	46.25 ^a	49.12 ^a	49.87 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.754	0.709	0.888	1.109	1.258	0.823	0.959
C**							
0	42.33	39.75	42.33	42.25	42.41	44.25 ^b	45.00
470	41.17	41.25	42.25	43.50	45.17	46.50 ^a	47.00
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.616	0.579	0.725	0.905	1.027	0.672	0.783
C × S							
0 × 0	44.50	37.00 ^b	37.50 ^c	40.00	36.25	35.00 ^d	35.00 ^c
470 × 0	41.25	42.00 ^a	43.00 ^{ab}	41.75	43.00	42.50 ^c	43.75 ^b
0 × 0.15	41.25	40.50 ^a	43.00 ^{ab}	41.75	44.75	47.00 ^b	50.00 ^a
470 × 0.15	41.00	40.00 ^a	41.25 ^b	42.50	46.25	49.50 ^{ab}	47.50 ^{ab}
0 × 0.3	41.25	41.75 ^a	46.50 ^a	45.00	46.25	50.75 ^a	50.00 ^a
470 × 0.3	41.25	41.75 ^a	42.50 ^{ab}	46.25	46.25	47.50 ^{ab}	49.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	1.067	1.003	1.257	1.569	1.778	1.165	1.356
سطح احتمال معنی‌دار P-value							
S	0.2154	0.1013	0.0118	0.0197	0.0028	<0.0001	<0.0001
C	0.1973	0.0837	0.9362	0.3421	0.0744	0.0295	0.0877
S×C	0.2639	0.0245	0.0036	0.9506	0.1662	0.0009	0.0014

S*: درصد سیرین افزوده‌شده به جیره، C**: کولین افزوده‌شده به جیره، میلی‌گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C**: mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$)

در جدول ۵ که تحلیل داده‌های مربوط به درصد زنده‌مانی اسپرم است، نشان داد که تیمارهای حاوی اسیدآمینه ال-سیرین و مکمل کولین تأثیر معنی‌داری بر این شاخص دارند ($P \leq 0.05$). در اثرات متقابل دو تیمار آزمایشی، بهبود زنده‌مانی اسپرم در تیمارهای دریافت‌کننده ۰/۳ درصد اسیدآمینه سیرین همراه با ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مکمل کولین مشاهده گردید. بالاترین درصد زنده‌مانی در اثر متقابل سیرین و کولین (۸۸/۷۵) در هفته هشتم و نهم مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گروه فاقد سیرین و کولین داشت ($P \leq 0.05$). پایین‌ترین درصد اسپرم‌های زنده مربوط به شاهد (۶۸/۲۵) بود. مکمل سیرین و کولین سبب افزایش تقریبی ۲۱ درصدی زنده‌مانی اسپرم شد. محصولات جانبی طبیعی حاصل از متابولیسم اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد را تشکیل می‌دهند که برای اسپرم بسیار سمی هستند و باعث کاهش درصد زنده‌مانی اسپرم می‌شوند (Wishart, 1984).

در نتایج بررسی تحرک کل اسپرم در جدول ۴، ال-سیرین و مکمل کولین به‌کاررفته در جیره نقش مهمی در افزایش معنی‌داری تحرک کل نسبت به تیمار فاقد سیرین و کولین نشان دادند ($P \leq 0.05$). اثر متقابل سیرین و کولین باعث افزایش معنی‌داری در تحرک اسپرم شد که این افزایش از هفته پنجم تا هفته نهم بود. بالاترین درصد تحرک کل اسپرم (۸۸/۷۵) مربوط به تیمار حاوی ۰/۱۵ درصد سیرین و ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین در هفته هشتم و نهم بود. کمترین درصد تحرک اسپرم مربوط به جیره شاهد بود (۷۰/۰۰) که اختلاف معنی‌داری با اثر متقابل دو تیمار داشت ($P \leq 0.05$). اثر متقابل دو تیمار باعث افزایش حدود ۱۹ درصد در تحرک کل اسپرم شد. طول دوره اسپرماتوژنز در خروس تقریباً ۱۵ روز می‌باشد (Durape, 2007). عدم تأثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی بر این فراسنجه در دو هفته اول آزمایش به‌دلیل عدم تکمیل یک دوره کامل اسپرماتوژنز می‌باشد.

به جلوگیری از بین رفتن فسفولیپیدهای غشایی اسپرم کمک کرد و همچنین باعث فعالیت فسفولیپازهای درون زایی شد که مولکول های آسیب دیده ناشی از تنش اکسیداتیو سلولی را ترمیم یا باعث تحلیل غشاء پس از پراکسیداسیون می شود که در نهایت منجر به کاهش آپوپتوز آکروزوم و افزایش سلامت غشاء اسپرم می شود (Long & Conn, 2012)، و نتایج آزمایش حاضر نیز مؤید آن می باشد. از آنجایی که ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم به دلیل خاصیت به شدت غیراشباع لیپیدهای اسپرم و آسیب پذیری این ترکیبات در برابر آسیب های پروکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن پایین است و این آسیب پذیری بالا دلیل اصلی ناباروری جنس نر محسوب می شود (Aitken, 1995) از این رو، وجود سیستم های آنتی اکسیدانی بی نقص در اسپرم و پلاسمای منی پرندگان برای محافظت گامت ها در برابر چنین اثرات زیان باری، حائز اهمیت می باشد (Surai et al., 2001).

پراکسیداسیون لیپید با کاهش فسفولیپیدهای غشایی همراه است که زنده ماندن و عملکرد اسپرم را به خطر می اندازد (Jones & Mann, 1976; Fujihara & Hawarth, 1978; Aitken, 1994; Kelso et al., 1996). در مطالعه ای که از مکمل های سیستمین و ارگوتامین و اسید آمینه ال سیرین به عنوان رقیق کننده منی جهت انجماد استفاده شده بود، مشخص گردید که افزودن سیرین به منی باعث کاهش پراکسیداسیون و افزایش تحرک، جنبایی پیش رونده و زنده ماندن اسپرم شد (Tananurak et al., 2020) که یافته های این مطالعه با آن مطابقت دارد. نشان داده شده است که فسفولیپیدهای متصل به غشاء، به ویژه فسفاتیدیل کولین، در طول ذخیره سازی در شرایط آزمایشگاهی اسپرم طیور از بین می روند (Douard et Blesbois et al., 1999; Douard et al., 2000). پراکسیداسیون لیپید و تجزیه آنزیمی سازوکاری است که باعث از دست دادن شدید فسفولیپیدهای غشاء اسپرم در طول ذخیره سازی مایع منی و کاهش زنده ماندن اسپرم می شود (Douard et al., 2005). در مطالعه ای، افزودن مکمل کولین در نگهدارنده مایع منی،

جدول ۴- اثر اسید آمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر تحرک کل (درصد) اسپرم خروس های مسن مادرگوشتی

Table 4- The effect of L-serine amino acid and choline supplementation on sperm total motility (percentage) of old broiler roosters

تیماها Treatments	هفته Week						
	سوم Third	چهارم Fourth	پنجم Five	ششم Six	هفتم Seventh	هشتم Eight	نهم Nine
*S							
0	76.62	76.25	76.125 ^b	75.37 ^b	73.75 ^b	75.37 ^b	77.00 ^b
0.15	76.25	78.25	81.37 ^a	81.87 ^a	83.75 ^a	86.12 ^a	88.37 ^a
0.3	76.37	78.25	81.88 ^a	83.75 ^a	85.00 ^a	88.12 ^a	88.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	1.035	0.970	0.958	0.988	1.178	0.890	0.767
**C							
0	75.25	76.75	78.67	79.17	78.33 ^b	80.67 ^b	82.17 ^b
470	77.58	78.41	80.91	81.50	83.33 ^a	85.75 ^a	86.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.845	0.792	0.782	0.806	0.962	0.727	0.626
C × S							
0 × 0	75.00	75.00	71.25 ^b	71.25 ^c	67.50 ^c	68.25 ^c	70.00 ^c
470 × 0	78.25	77.50	81.00 ^a	79.50 ^b	80.00 ^b	82.50 ^b	84.00 ^b
0 × 0.15	75.00	77.75	82.25 ^a	81.25 ^{ab}	83.75 ^{ab}	85.00 ^{ab}	88.00 ^a
470 × 0.15	77.50	78.75	80.50 ^a	82.50 ^{ab}	83.75 ^{ab}	87.25 ^a	88.75 ^a
0 × 0.3	75.75	77.50	82.50 ^a	85.00 ^a	83.75 ^{ab}	88.75 ^a	88.50 ^a
470 × 0.3	77.00	79.00	81.25 ^a	82.50 ^{ab}	86.25 ^a	87.50 ^a	87.50 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	1.464	1.371	1.355	1.397	1.677	1.260	1.084
سطح احتمال معنی دار P-value							
S	0.9667	0.2682	0.0007	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C	0.0668	0.1541	0.0570	0.0557	0.0017	0.0001	<0.0001
S×C	0.7907	0.8576	0.0006	0.0040	0.0035	<0.0001	<0.0001

*S: درصد سیرین افزوده شده به جیره، C**: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C**: mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$)

جدول ۵- اثر اسید آمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر زنده ماندن اسپرم (درصد) خروس‌های مسن مادرگوشتی

Table 5- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on sperm viability (percentage) of old broiler roosters

تیماها Treatments	هفته Week						
	سوم Third	چهارم Fourth	پنجم Five	ششم Six	هفتم Seventh	هشتم Eight	نهم Nine
S*							
0	73.12	76.50	74.37 ^b	75.25 ^b	76.50 ^b	74.75 ^c	74.87 ^b
0.15	74.62	76.62	80.37 ^a	81.50 ^a	82.50 ^a	83.37 ^b	86.12 ^a
0.3	74.37	78.62	82.50 ^a	82.50 ^a	83.12 ^a	88.62 ^a	87.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	1.291	0.901	0.937	0.740	0.902	0.799	0.853
C**							
0	72.75	76.41	78.92	77.67 ^b	79.17 ^b	80.58 ^b	80.83 ^b
470	75.33	78.08	79.25	81.83 ^a	82.25 ^a	83.92 ^a	85.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	1.054	0.735	0.765	0.604	0.737	0.652	0.697
C × S							
0 × 0	71.25	74.75	71.75 ^c	70.50 ^b	71.25 ^b	70.25 ^d	68.25 ^c
470 × 0	75.00	78.25	77.00 ^b	80.00 ^a	81.75 ^a	79.25 ^c	81.50 ^b
0 × 0.15	73.25	76.25	82.50 ^a	80.00 ^a	82.50 ^a	83.00 ^b	85.50 ^a
470 × 0.15	76.00	77.00	78.25 ^{ab}	83.00 ^a	82.50 ^a	83.75 ^b	86.75 ^a
0 × 0.3	73.75	78.25	82.50 ^a	82.50 ^a	83.75 ^a	88.50 ^a	88.75 ^a
470 × 0.3	75.00	79.00	82.50 ^a	82.50 ^a	82.50 ^a	88.75 ^a	86.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	1.827	1.274	1.325	1.047	1.276	1.130	1.208
سطح احتمال معنی دار P-Value							
S	0.6845	0.2021	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C	0.1004	0.1267	0.7631	0.0001	0.0084	0.0020	0.0005
S×C	0.7912	0.4752	0.0077	0.0008	0.0004	0.0016	<0.0001

S*: درصد سیرین افزوده شده به جیره، C**: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C**: mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

قابل توجهی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز افزایش می‌یابد و با تکثیر و تمایز اسپرم باعث افزایش باروری می‌شود (Wang et al., 2016). پس می‌توان نتیجه گرفت که افزودن مکمل‌هایی چون اسید آمینه ال سیرین با خاصیت آنتی اکسیدانی به جیره خروس‌های مادر مسن برای جلوگیری از این کاهش در انتهای چرخه تولیدمثلی ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج حاصل از بررسی سلامت غشاء اسپرم در جدول ۶ نشان داد که اثر متقابل سیرین و کولین سبب افزایش بهبود یکپارچگی و سلامت غشاء اسپرم شد و نسبت به گروه شاهد روند افزایشی داشت که این افزایش درصد سلامت غشاء اسپرم از هفته ششم تا هفته نهم معنی دار شد ($P \leq 0.05$). بالاترین درصد سلامت غشاء اسپرم در تیمارهای حاوی ۰/۳ درصد سیرین (۸۸/۰۰) در هفته نهم و پایین‌ترین درصد سلامت غشاء مربوط به گروه فاقد سیرین و کولین (۶۸/۷۵) بود. هم‌افزایی دو تیمار سبب افزایش ۱۲ درصدی سلامت غشاء اسپرم

کمبود مؤلفه‌های کلیدی سیستم آنتی اکسیدانی را می‌توان به عنوان دلیلی بر کاهش باروری تحت برخی از شرایط در نظر گرفت، برای مثال در انتهای چرخه تولیدمثلی خروس، بیان آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز در منی بیش از ۱۰ برابر کاهش می‌یابد (Kelso et al., 1997)، بنابراین استفاده از مکمل‌هایی مثل عنصر سلنیوم (جزء ضروری گلوتاتیون پراکسیداز) در جیره خروس‌ها، فعالیت این آنزیم را در بیضه‌ها، اسپرم‌ها و پلاسمای منی افزایش، و حساسیت اسپرم به پراکسیداسیون لیپید را کاهش داد (Surai et al., 1998). مکمل ال سیرین با توجه به ویژگی‌های آنتی اکسیدانی مرتبط با کاهش واکنش‌های اکسیداتیو از طریق کنترل بیان ژن‌های مرتبط با سنتز گلوتاتیون باعث افزایش غلظت گلوتاتیون می‌شود (Zhou et al., 2018; Sim et al., 2015). مالون دی‌آلدئید، و افزایش سوپراکسیداز و آنزیم کاتالاز (Zhou et al., 2018) می‌شود در نتیجه مصرف اسید آمینه ال سیرین به میزان

است که اسیدآمینة سرین در طول نگهداری با دولاپیة‌های فسفولیپیدی غشاء تعامل دارند و باعث تثبیت غشاء سلولی می‌شوند، همچنین غلظت اصلاح سمی را کاهش داده و سلول‌ها را در برابر اثرات دنا توره‌کننده هاپراسمولالیتة در طول انجماد منی محافظت می‌کند (Partyka & Nizański, 2021). در مطالعه‌ای نشان داده شد که افزودن سرین به پلاسمای منی خروس به‌عنوان نگهدارنده سبب حفظ یکپارچگی DNA در منی منجمد شده و بر یکپارچگی غشاء و آکروزوم، پتانسیل غشاء میتوکندری، کاهش شاخص مالون دی‌آلدهید، افزایش قدرت اسپرم و در نتیجه تمام شاخص‌های کیفیت اسپرم در شرایط آزمایشگاهی و در نهایت در توانایی لقاح اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده مؤثر بود (Santiago-Moreno et al., 2019). افزایش درصد سلامت غشاء اسپرم و زنده‌مانی می‌تواند سبب افزایش سرعت در حرکت و افزایش زنده‌مانی اسپرم در داخل اویدکت تا رسیدن به محل لقاح می‌شود (Cerolini et al., 2006). از آنجایی که فسفاتیدیل سرین به‌صورت نسبتی از فسفولیپید تام اسپرم همبستگی مثبتی با قابلیت باروری دارد و همچنین فسفاتیدیل سرین اسپرم ۳۳ درصد وزن تام اسیدهای چرب را دارا می‌باشد که به مراتب بیشتر از مقدار آن در دیگر انواع فسفولیپیدها است (Surai et al., 1998). در نتیجه افزایش معنی‌دار سلامت غشاء اسپرم در تیمارهای حاوی اسیدآمینة سرین و مکمل کولین نسبت به گروه شاهد منطقی به نظر می‌رسد.

بررسی میزان درصد ناهنجاری‌های اسپرم جدول ۷ نشان داد که تیمارهای حاوی سرین تأثیر معنی‌داری بر این شاخص دارند ($P \leq 0.05$)، به‌طوری‌که افزودن ال-سرین در دو سطح ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد باعث کاهش درصد اسپرم‌های ناهنجار شد که این کاهش در هفته پنجم و هفتم معنی‌دار گردید. کمترین درصد اسپرم ناهنجار (۱۳/۶۲) در تیمار حاوی ۰/۳ درصد سرین مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با جیره فاقد سرین نشان داد ($P \leq 0.05$). اثر مکمل کولین و اثر متقابل اسیدآمینة سرین و کولین بر درصد اسپرم‌های ناهنجار معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). این نتایج با گزارش لانگ و همکاران (Long & Conn, 2012) که برای ذخیره‌سازی منی بوقلمون از مکمل کولین فسفات استفاده و کاهش درصد ناهنجاری‌های آکروزوم سر اسپرم را گزارش کرده بودند، مطابقت دارد. در تحقیقی دیگر از اسیدآمینة ال سرین به‌عنوان رقیق‌کننده، جهت ذخیره‌سازی اسپرم خروس در دمای پنج درجه سانتی‌گراد در طول ۱۲۰ ساعت استفاده شد و افزایش تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و عملکرد میتوکندریایی و کاهش درصد اسپرم‌های ناهنجار در گروه‌های حاوی رقیق‌کننده سرین نسبت به گروه شاهد گزارش شد (Kheawkanha et al., 2023) که هم‌سو با نتایج این تحقیق می‌باشد.

پرنندگان شد. در تحقیق لانگ و کان (Long & Conn, 2012) که با استفاده از مکمل کولین بر عملکرد منی ذخیره‌شده بوقلمون از ۴ تا ۲۴ ساعت انجام شد، استفاده از ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مکمل فسفاتیدیل کولین، سلامت غشاء اسپرم ذخیره‌شده را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید که با نتایج این آزمایش و اثرات مثبت مکمل کولین در جیره هم‌خوانی دارد. پراکسیداسیون غشاء اسپرم یکی از عوامل بسیار مهم در کاهش کیفیت اسپرم می‌باشد (Guthrie et al., 2008). لیپیدهای غشاء سلول اسپرم نقش اساسی در قابلیت لقاح اسپرم دارند (Masoudi et al., 2016). یکی از دلایل اصلی ناباروری در خروس‌ها، محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در اسپرم‌ها است که آن‌ها را مستعد پراکسیداسیون لیپید می‌کند (Asl et al., 2018). اسپرم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پایینی دارد، بنابراین آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمای منی با مهار گونه‌های فعال اکسیژن از اسپرم محافظت می‌کنند (Zhao et al., 2011). اسپرم پرنندگان با محتوای بالای اسیدهای چرب چند غیراشباع زنجیره بلند که برای حفظ تحرک اسپرم ضروری هستند، مستعد پراکسیداسیون لیپیدی هستند. گونه‌های واکنشی تولیدشده بر اثر پراکسیداسیون لیپیدی ممکن است به عملکرد غشاء اسپرم و تحرک آن‌ها آسیب رسانده و پتانسیل باروری را در خروس‌های مسن کاهش دهند. بنابراین، دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش کلیدی در حفظ کیفیت مایع منی دارد (Surai et al., 2006). سلامت غشاء یکی از مهم‌ترین عوامل در قابلیت باروری اسپرم است، زیرا غشاء اسپرم به‌دلیل شکل طویل باریک و دنباله‌دار در اسپرماتوزوئیدهای پرنندگان و افزایش سطح به حجم آن‌ها نسبت به اسپرم پستانداران افزایش سطح زیادی دارد، بنابراین نسبت غشاء پلاسمایی اسپرماتوزوئید پرنندگان بیشتر است و سلامت و انعطاف‌پذیری و تحرک سلول اسپرم که ارتباط مستقیمی با غشای سلول دارد، نقش مهمی در بالا رفتن کیفیت منی و تسهیل فرآیندهای باروری دارد (Steele et al., 1994). اسپرم‌ها سلول‌هایی به‌شدت قطبی، شامل نواحی سر، قطعه میانی و دم با عملکردهای مجزا می‌باشند. فسفولیپیدهایی که غشاء پلاسمایی و غشاهای آکروزومی ناحیه سر اسپرم را تشکیل می‌دهند، در فعالیت‌های دینامیکی مختلف مربوط به فرآیند امتزاج غشاها (که نقش تعیین‌کننده‌ای در واکنش آکروزومی و آمیزش اسپرم و تخم دارد) نقش دارند. واکنش آکروزومی هنگامی روی می‌دهد که بین اسپرم و تخمک تماس حاصل گردد. اجزای مولکولی پوشش محافظ تخم (لایه پری ویتیلین در پرنندگان) به‌طور اختصاصی با گیرنده‌های پروتئینی ویژه موجود در غشاء پلاسمایی سر اسپرم اتصال برقرار می‌کنند (Ashizawa et al., 2006)، بنابراین بررسی یک روش زیست‌سازگار مانند یک افزودنی خوراکی با قدرت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی می‌تواند به‌طور قابل توجهی از باروری خروس‌ها محافظت کند (Nemati et al., 2022). مشخص شده

جدول ۶- اثر اسیدآمینه ال-سرین و مکمل کولین بر سلامت غشاء اسپرم (درصد) خروس‌های مسن مادرگوشتی

Table 6- The effect of L-serine amino acid and choline supplementation on sperm membrane health (percentage) of old broiler breeder roosters

تیماها Treatments	هفته week						
	سوم Third	چهارم Fourth	پنجم Five	ششم Six	هفتم Seventh	هشتم Eight	نهم Nine
*S							
0	77.62	75.87 ^b	75.00 ^b	75.62 ^b	76.88 ^b	76.00 ^b	74.37 ^b
0.15	76.25	77.50 ^{ab}	81.37 ^a	82.12 ^a	83.13 ^a	86.75 ^a	86.25 ^a
0.3	76.00	79.37 ^a	81.87 ^a	82.75 ^a	82.50 ^a	86.50 ^a	87.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.929	0.951	0.892	0.848	0.945	0.722	0.974
**C							
0	75.75	76.67	78.67	78.08 ^b	79.33 ^b	81.33 ^b	80.58 ^b
470	77.50	78.50	80.17	82.25 ^a	82.33 ^a	84.83 ^a	85.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.758	0.777	0.728	0.692	0.771	0.589	0.796
C × S							
0 × 0	76.50	73.50	72.50	70.00 ^b	71.75 ^b	71.00 ^c	68.75 ^c
470 × 0	78.75	78.25	77.50	81.25 ^a	82.00 ^a	81.00 ^b	80.00 ^b
0 × 0.15	75.00	77.50	81.00	81.75 ^a	83.75 ^a	86.75 ^a	85.00 ^a
470 × 0.15	77.50	77.50	81.75	82.50 ^a	82.50 ^a	86.75 ^a	87.50 ^a
0 × 0.3	75.75	79.00	82.50	82.50 ^a	82.50 ^a	86.25 ^a	88.00 ^a
470 × 0.3	76.25	79.75	81.25	83.00 ^a	82.50 ^a	86.75 ^a	87.50 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	1.313	1.364	1.261	1.199	1.336	1.021	1.378
سطح احتمال معنی دار P-value							
S	0.4290	0.0565	<0.0001	<0.0001	0.0003	<0.0001	<0.0001
C	0.1201	0.1127	0.1624	0.0005	0.0132	0.0005	0.0010
S×C	0.7134	0.1940	0.0646	0.0003	0.0007	0.0001	0.0013

S*: درصد سرین افزوده شده به جیره، C**: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C** mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$)

غلظت اسپرم، سلامت غشاء اسپرم، تحرک کل اسپرم، زنده‌مانی اسپرم، تحرک پیش‌رونده اسپرم و کاهش درصد ناهنجاری‌های اسپرم در بیشتر هفته‌های آزمایش بود که نشان‌دهنده هم‌افزایی این دو ترکیب در بهبود کیفیت اسپرم در خروس‌های مسن مولد گوشتی شد و این امر می‌تواند باعث افزایش باروری و بهره‌وری هرچه بیشتر خروس‌های مسن مادرگوشتی در صنعت طیور شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت فراهم‌نمودن امکانات پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

با توجه به اینکه تحرک اسپرم و کم بودن درصد اسپرم‌های ناهنجار، معیاری برای کیفیت و زنده‌مانی اسپرم در ارتباط با باروری در طیور است (Froman *et al.*, 2002; Bowling *et al.*, 2003)، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کاهش درصد اسپرم‌های ناهنجار در تیمارهای حاوی اسیدآمینه سرین و مکمل کولین باعث افزایش کیفیت منی و در نهایت بهبود کیفیت باروری در این آزمایش شد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از اسیدآمینه ال-سرین و مکمل کولین در جیره می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار

جدول ۷- اثر اسیدآمینه ال-سرین و مکمل کولین بر اسپرم‌های ناهنجار (درصد) خروس‌های مسن مادرگوشتی

Table 7- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on abnormal sperm (percentage) of old broiler roosters

تیمارها Treatments	هفته Week						
	سوم Third	چهارم Fourth	پنجم Five	ششم Six	هفتم Seventh	هشتم Eight	نهم Nine
*S							
0	14.75	14.62	14.62 ^a	14.25	14.37 ^a	14.37	14.12
0.15	14.50	14.50	14.25 ^{ab}	14.12	14.25 ^{ab}	13.75	13.87
0.3	14.50	14.37	13.75 ^b	14.37	13.62 ^b	13.87	13.87
انحراف استاندارد میانگین	0.186	0.177	0.200	0.195	0.212	0.257	0.253
SEM							
**C							
•	14.50	14.58	14.42	14.25	14.08	14.00	14.17
470	14.67	14.42	14.00	14.25	14.08	14.00	13.75
انحراف استاندارد میانگین	0.152	0.144	0.163	0.159	0.173	0.210	0.207
SEM							
C × S							
0 × 0	14.75	15.00	14.75	14.50	14.25	14.50	14.50
470 × 0	14.75	14.25	14.50	14.00	14.50	14.25	13.75
0 × 0.15	14.25	14.50	14.50	14.00	14.50	13.50	14.00
470 × 0.15	14.75	14.50	14.00	14.25	14.00	14.00	13.75
0 × 0.3	14.50	14.25	14.00	14.25	13.50	14.00	14.00
470 × 0.3	14.50	14.50	13.50	14.50	13.75	13.75	13.75
انحراف استاندارد میانگین	0.263	0.250	0.282	0.276	0.300	0.363	0.358
SEM							
سطح احتمال معنی‌دار P-value							
S	0.5594	0.6147	0.0210	0.6703	0.0492	0.2183	0.7272
C	0.4486	0.4249	0.0877	1.0000	1.0000	1.0000	0.1716
S×C	0.5594	0.1435	0.8885	0.3165	0.3743	0.5047	0.7272

S*: درصد سرین افزوده‌شده به جیره، C**: کولین افزوده‌شده به جیره، میلی‌گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet C** mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

References

- Abbaspour, B., Sharifi, S. D., Ghazanfari, S., Honarbakhsh, S., & Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2019). The effect of l-arginine and flaxseed on plasma testosterone concentration, semen quality and some testicular histology parameters in old broiler breeder roosters. *Theriogenology*, 128, 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.034>
- Aitken, R. J. (1994). A free radical theory of male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*, 6(1), 19-23. <https://doi.org/10.1071/RD9940019>
- Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 659-668. <https://doi.org/10.1071/RD9950659>
- Akhlaghi, A., Ahangari, Y. J., Navidshad, B., Pirsaraei, Z. A., Zhandi, M., Deldar, H., & Peebles, E. D. (2014). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Cobb 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). *Poultry Science*, 93(5), 1236-1244. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03617>
- Amini, M. R., Kohram, H., Zare Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharideh, H., & Nabi, M. M. (2015). The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cell and Tissue Banking*, 16, 587-592. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9506-9>
- Andraszek, K., Banaszewska, D., & Biesiada-Drzazga, B. (2018). The use of two staining methods for

- identification of spermatozoon structure in roosters. *Poultry Science*, 97(7), 2575-2581. <https://doi.org/10.3382/ps/pey056>
7. Ansari, M., Zhandi, M., Kohram, H., Zaghari, M., & Sadeghi, M. (2016). The effect of D-aspartic acid on sperm quality of broiler breeder roosters. *Iranian Journal of Animal Science*, 47(1), 165-174. <https://doi.org/10.22059/ijas.2016.61669>
8. Ashizawa, K., Wishart, G. J., Katayama, S., Takano, D., Ranasinghe, A. R. A. H., Narumi, K., & Tsuzuki, Y. (2006). Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or-type 2A. *Reproduction*, 131(6), 1017-1024. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01069>
9. Asl, R. S., Shariatmadari, F., Sharafi, M., Torshizi, M. A. K., & Shahverdi, A. (2018). Dietary fish oil supplemented with vitamin E improves quality indicators of rooster cold-stored semen through reducing lipid peroxidation. *Cryobiology*, 84, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.008>
10. Blesbois, E., Douard, V., Germain, M., Boniface, P., & Pellet, F. (2004). Effects of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. *Theriogenology*, 61(2-3), 537-549. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00207-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00207-3)
11. Blesbois, E., Grasseau, I., & Hermier, D. (1999). Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 C. *Theriogenology*, 52(2), 325-334. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00132-6)
12. Bowling, E. R., Froman, D. P., Davis, A. J., & Wilson, J. L. (2003). Attributes of broiler breeder males characterized by low and high sperm mobility. *Poultry Science*, 82(11), 1796-1801. <https://doi.org/10.1093/ps/82.11.1796>
13. Cerolini, S., Pizzi, F., Gliozzi, T., Maldjian, A., Zaniboni, L., & Parodi, L. (2003). Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. *World's Poultry Science Journal*, 59(1), 65-75. <https://doi.org/10.1079/WPS20030003>
14. Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A., & Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66(4), 877-886. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.022>
15. Chankitisakul, V., Boonkum, W., Kaewkanha, T., Pimprasert, M., Ratchamak, R., Authaida, S., & Thananurak, P. (2022). Fertilizing ability and survivability of rooster sperm diluted with a novel semen extender supplemented with serine for practical use on smallholder farms. *Poultry Science*, 101(12), 102188. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102188>
16. Darin-Bennett, A., Poulos, A., & White, I. G. (1974). The phospholipids and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *Reproduction*, 41(2), 471-474. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0410471>
17. Del Vesco, A. P., Gasparino, E., Neto, A. R. O., Rossi, R. M., Soares, M. A. M., & da Silva, S. C. C. (2013). Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. *Livestock Science*, 151(2-3), 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.11.005>
18. Do Nascimento, R. C., Souza, C. M. M., Bastos, T. S., Kaelle, G. C. B., de Oliveira, S. G., & Félix, A. P. (2022). Effects of an herbal source of choline on diet digestibility and palatability, blood lipid profile, liver morphology, and cardiac function in dogs. *Animals*, 12(19), 2658. <https://doi.org/10.3390/ani12192658>
19. Douard, V., Hermier, D., & Blesbois, E. (2000). Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1450-1456. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1450>
20. Douard, V., Hermier, D., Labbe, C., Magistrini, M., & Blesbois, E. (2005). Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during in vitro storage. *Theriogenology*, 63(1), 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.020>
21. Durape, N. M. (2007). Phytochemicals improve semen quality and fertility. *Mortality*, 3, 2-4b. <https://doi.org/10.22059/jap.2019.280344.623396>
22. Etches, R. J. (1996). Reproduction in poultry. Centre for Agriculture and Biosciences International Wallingford, UK. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093225492>
23. Fouad, A. M., El-Senousey, H. K., Ruan, D., Xia, W., Chen, W., Wang, S., & Zheng, C. (2020). Nutritional modulation of fertility in male poultry. *Poultry Science*, 99(11), 5637-5646. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.083>
24. Froman, D. P., Pizzari, T., Feltmann, A. J., Castillo-Juarez, H., & Birkhead, T. R. (2002). Sperm mobility: Mechanisms of fertilizing efficiency, genetic variation and phenotypic relationship with male status in the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1491), 607-612. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1925>
25. Fujihara, N., & Howarth Jr, B. (1978). Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 57(6), 1766-1768. <https://doi.org/10.3382/ps.0571766>
26. Guthrie, H. D., Welch, G. R., & Long, J. A. (2008). Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology*, 70(8), 1209-1215. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.017>
27. Hunter, T. (2012). Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical Transactions of the Royal*

- Society B: Biological Sciences*, 367(1602), 2513-2516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0013>
28. Jones, R., & Mann, T. R. R. (1976). Lipid peroxides in spermatozoa; formation, rôle of plasmalogen, and physiological significance. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 193(1113), 317-333. <https://doi.org/10.1098/rspb.1976.0050>
29. Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C., Sparks, N. C., & Speake, B. K. (1996). Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Reproduction*, 106(2), 201-206. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060201>
30. Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C., Sparks, N. H., & Speake, B. K. (1997). The effects of dietary supplementation with docosahexaenoic acid on the phospholipid fatty acid composition of avian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1), 65-69. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(97\)00024-2](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(97)00024-2)
31. Kheawkanha, T., Chankitisakul, V., Thananurak, P., Pimprasert, M., Boonkum, W., & Vongpralub, T. (2023). Solid storage supplemented with serine of rooster semen enhances higher sperm quality and fertility potential during storage at 5 C for up to 120 h. *Poultry Science*, 102(6), 102648. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102648>
32. Long, J. A., & Conn, T. L. (2012). Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. *Poultry Science*, 91(8), 1990-1996. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02028>
33. Masoudi, R., Sharafi, M., Shahneh, A. Z., Towhidi, A., Kohram, H., Zhandi, M., Esmaili, V., & Shahverdi, A. (2016). Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin- and egg yolk-based extenders. *Theriogenology*, 86(6), 1583-1588. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.018>
34. Metcalf, E. S., Dideon, B. A., Blehr, R., Schlimgen, T., Bertrand, W., Varner, D. D., & Hausman, M. S. (2008). Effects of DMSO and L-Ergothioneine on post-thaw semen parameters in stallions: Preliminary results. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 332-333. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.1646>
35. Nemati, Z., Dehgani, P., Besharati, M., & Amirdahri, S. (2022). Dietary carob fruit (*Ceratonia siliqua* L.) supplementation improves spermatogenesis, semen quality and embryonic death via antioxidant effect in aging broiler breeder roosters. *Animal Reproduction Science*, 239, 106967. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106967>
36. Partyka, A., & Nizański, W. (2021). Supplementation of avian semen extenders with antioxidants to improve semen quality—Is it an effective strategy. *Antioxidants*, 10(12), 1927. <https://doi.org/10.3390/antiox10121927>
37. Romero-Sanchez, H., Plumstead, P. W., Leksrisompong, N., Brannan, K. E., & Brake, J. (2008). Feeding broiler breeder males. 4. Deficient feed allocation reduces fertility and broiler progeny body weight. *Poultry Science*, 87(4), 805-811. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00285>
38. Salem Jr, N., Kim, H. Y., & Yervey, J. A. (1986). Docosahexaenoic acid: Membrane function and metabolism. *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*, 15, 263-317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-644360-8.50019-4>
39. Santiago-Moreno, J., Bernal, B., Perez-Cereales, S., Castano, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M.C., Gutiérrez-Adán, A., López-Sebastián, A., Gil, M.G., Woelders, H. and Blesbois, E. (2019). Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PloS one*, 14(1), p.e0209910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910>
40. Sarabia Frago, J., Pizarro Díaz, M., Abad Moreno, J. C., Casanovas Infesta, P., Rodríguez-Bertos, A., & Barger, K. (2013). Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reproduction in Domestic Animals*, 48(2), 345-352. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00285>
41. Sim, W. C., Yin, H. Q., Choi, H. S., Choi, Y. J., Kwak, H. C., Kim, S. K., & Lee, B. H. (2015). L-serine supplementation attenuates alcoholic fatty liver by enhancing homocysteine metabolism in mice and rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 260-267. <https://doi.org/10.3945/jn.114.199711>
42. Steele, M. G., Meldrum, W., Brillard, J. P., & Wishart, G. J. (1994). The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer *in vitro* and *in vivo*. *Reproduction*, 101(3), 599-603. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010599>
43. Surai, P. F., Cerolini, S., Wishart, G. J., Speake, B. K., Noble, R. C., & Sparks, N. H. (1998). Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poultry and Arian Biolog*, 9(1), 11-23.
44. Surai, P. F., Fujiwara, N., Speake, B. K., Brillard, J. P., Wishart, G. J., & Sparks, N. H. C. (2001). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(7), 1024-1050. <https://doi.org/10.5713/ajas.2001.1024>
45. Surai, P. F., Sparks, N. H. C., & Speake, B. K. (2006). The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. (September) Xii European Poultry Conference September, pp. 10-14.
46. Surai, P., Kostjuk, I., Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R., & Kutz, E. (1998). Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biological Trace Element Research*, 64, 119-132. <https://doi.org/10.1007/BF02783329>

47. Tapeh, R. S., Zhandi, M., Zaghari, M., & Akhlaghi, A. (2017). Effects of guanidinoacetic acid diet supplementation on semen quality and fertility of broiler breeder roosters. *Theriogenology*, 89, 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.012>. (In Persian)
48. Thananurak, P., Chuaychu-Noo, N., Thélie, A., Phasuk, Y., Vongpralub, T., & Blesbois, E. (2020). Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm. *Poultry Science*, 99(2), 1185-1198. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.040>
49. Wang, Q., Sun, L. C., Liu, Y. Q., Lu, J. X., Han, F., & Huang, Z. W. (2016). The synergistic effect of serine with selenocompounds on the expression of SelP and GPx in HepG2 cells. *Biological Trace Element Research*, 173, 291-296. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0665-8>
50. Wishart, G. J. (1984). Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. *Reproduction*, 71(1), 113-118. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0710113>
51. Zamiri, M. J., Khalili, B., Jafaroghli, M., & Farshad, A. (2010). Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. *Small Ruminant Research*, 94(1-3), 132-136. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.013>
52. Zhao, X., Yang, Z. B., Yang, W. R., Wang, Y., Jiang, S. Z., & Zhang, G. G. (2011). Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability. *Poultry Science*, 90(8), 1720-1727. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01280>
53. Zhou, X., He, L., Zuo, S., Zhang, Y., Wan, D., Long, C., Huang, P., Wu, X., Wu, C., Liu, G. and Yin, Y. (2018a). Serine prevented high-fat diet-induced oxidative stress by activating AMPK and epigenetically modulating the expression of glutathione synthesis-related genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(2), pp.488-498. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.009>
54. Zhou, X., Zhang, Y., Wu, X., Wan, D., & Yin, Y. (2018b). Effects of dietary serine supplementation on intestinal integrity, inflammation and oxidative status in early-weaned piglets. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(3), 993-1002. <https://doi.org/10.1159/000491967>